نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۵، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۰، ص. ۱۸۲-۱۶۹
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 35, No.2, Summer 2021, P. 169-182
ISSN: 2008 - 4730

مقاله پژوهشی

مطالعه وجود SNPها در ژن‌های *SUN* و *OVATE* دخیل در شکل میوه گوجه‌فرنگی

ساناز خضرلو[۱]- بابک عبدالهی مندولکانی[۲*]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۲۸

چکیده

شکل میوه از صفات بسیار مهم و موثر در کیفیت گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) بوده و ژن‌های *SUN* و*OVATE* از ژن‌های کلیدی کنترل کننده طول میوه می‌باشند. به منظور شناسایی SNPها (Single nucleotide polymorphism) در این ژن‌ها، قطعاتی از نواحی کد کننده آنها در ۹۶ ژنوتیپ گوجه‌فرنگی تکثیر و با آنزیم‌های محدود کننده *TruI* و *PstI* هضم شد. هضم قطعات تکثیری این دو ژن در ژنوتیپ‌ها چندشکلی تولید نکرد بنابراین چهار ژنوتیپ از جمعیت‌های مختلف انتخاب و قطعه تکثیری ژن‌ها در این ژنوتیپ‌ها توالی‌یابی شد. همردیفی توالی‌ها برای شناسایی SNPها با استفاده از نرم افزار Clustal Omega انجام گرفت. توالی‌یابی قطعه تکثیری ژن *SUN* منجر به شناسایی یک ناحیه اینترونی به طول ۳۶۹ جفت باز شد. بر اساس نتایج، در ژن *SUN* ده SNP شناسایی شد. از کل SNPهای شناسایی شده در این ژن، ۸۰ درصد آنها از نوع همجنس و ۲۰ درصد آنها از نوع غیرهمجنس بود. در ژن *OVATE* پنج SNP شناسایی شد که ۸۰ درصد آنها از نوع همجنس و ۲۰ درصد آنها از نوع غیرهمجنس بود. میانگین تعداد SNPها به ازای هر ۱۰۰ جفت باز در نواحی اگزونی و اینترونی ژن *SUN* به ترتیب ۰/۹ و ۱/۶۲ بود. در ژن *OVATE* به ازای هر ۱۰۰ جفت باز نیم SNP در ناحیه اگزونی شناسایی شد. با توجه به نقش مهم کیفیت میوه بخصوص شکل آن در بازارپسندی گوجه‌فرنگی، SNPهای شناسایی شده در این تحقیق می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی گوجه فرنگی برای مطالعه تنوع ژنتیکی، تهیه نقشه‌های ژنتیکی و شناسایی نشانگرهای عملکردی مرتبط با شکل میوه مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: تنوع تک نوکلئوتیدی، جهش‌های همجنس، شکل میوه، گوجه‌فرنگی

مقدمه

گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) یکی از گیاهان مهم خانواده Solonaseae می‌باشد. این گیاه به علت ویژگی‌های مهمی مثل توانایی تولید بذر، چرخه زندگی کوتاه، توانایی رشد تحت شرایط کشت مختلف، ژنوم کوچک، کنترل آسان گرده‌افشانی، خودگشن و هموزیگوت بودن، هیبریداسیون، (۱۶) و توانایی تولید مثل غیرجنسی بوسیله پیوند و امکان باززایی گیاهان از ریز نمونه‌های مختلف، یک نمونه معین برای معرفی ژن‌های مهم زراعی در گیاهان دو لپه‌ای و مناسب برای برنامه‌های تحقیقاتی می‌باشد (۲، ۱۳ و ۲۰). گوجه‌فرنگی یکی از مهمترین سبزی‌های زیر کشت و کار در جهان است که ارزش غذایی بالایی داشته و یک منبع مهم از نظر مواد کانی، کاروتنوئیدها و ویتامین‌ها به شمار می‌رود (۱۸ و ۱۹). لیکوپن گوجه فرنگی بدلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی توجه زیادی را به خود جلب کرده است (۲۱). به همین دلیل افزایش عملکرد، بهبود شکل، اندازه، کیفیت میوه مانند رنگ، بافت و سفتی میوه، میزان قند، اسیدیته، موادجامد محلول، لیکوپن، بتاکاروتن و مواد اکسیدکننده ازجمله اهداف مهم اصلاحی در گوجه‌فرنگی به شمار می‌آید (۱۲).

کیفیت میوه گوجه‌فرنگی نقش مهمی در بازار پسندی و در نتیجه اقتصاد آن دارد. کیفیت میوه گوجه‌فرنگی با عواملی مانند شکل، رنگ، گوشتی بودن، استحکام و طعم ارزیابی می‌شود. افزون بر این عامل‌ها، ارزش غذایی میوه گوجه‌فرنگی، استفاده نکردن حشره‌کش‌ها و قارچ کش‌ها و تولید ارگانیک نیز در کیفیت آن نقش دارد (۶). امروزه گوجه‌فرنگی بیشترین تنوع را از نظر شکل میوه، اندازه و رنگ دارد. با وجود تفاوت‌های چشم‌گیر صفات مختلف این گیاه، ارقام مختلف گوجه‌فرنگی فقط در تعداد انگشت شماری از ژن‌ها باهم تفاوت دارند (۵، ۱۷). شکل میوه گوجه‌فرنگی یکی از صفات مربوط به کیفیت است که توسط چندین ژن کنترل می‌شود. بر اساس مطالعات ژنتیک

۱ و ۲- به‌ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورری و استاد گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه ارومیه
(*- نویسنده مسئول: Email: b.abdollahi@urmia.ac.ir)
DOI: 10.22067/jhs.2021.61531.0

مولکولی ژن‌های مختلفی در شکل میوه گوجه‌فرنگی دخالت دارد از جمله این ژن‌ها می‌توان به *SUN* و *OVATE* اشاره کرد. این دو ژن متعلق به خانواده ژنی IQD [1] می‌باشد (۸ و ۱۴). همسانه‌سازی و بررسی عملکرد ژن *SUN* نشان داد که این ژن طول میوه را کنترل می‌کند (۱۰، ۲۱ و ۲۲). بررسی‌ها نشان داد که بیان بالای این ژن منجر به افزایش سلول‌ها در امتداد طولی و کاهش سلول‌ها در جهت عرض میوه و در نتیجه باعث افزایش طول میوه می‌گردد (۲۱). ژن *OVATE* نیز کنترل طول میوه را بر عهده دارد. تحقیقات نشان داده جهش یک کدون ژن *OVATE* باعث تغییر شکل میوه گوجه فرنگی از حالت کروی به گلابی شکل می‌شود. بیان بیشتر ژن *OVATE* باعث کاهش اندازه گل و برگ می‌شود از این رو این ژن به عنوان یک تنظیم کننده منفی رشد گیاه شناخته می‌شود (۱۴).

نشانگرهای مولکولی وابسته به DNA از جمله ابزارهای قدرتمند تشخیصی هستند که نه تنها برای شناسایی چندشکلی در سطح ژنوم بلکه در رابطه با مکان‌های ژنتیکی خاص نیز مورد استفاده قرار می گیرند (۳). از جمله نشانگرهای DNA کارا که امروزه در مطالعات ژنتیکی بیشتر مورد توجه قرار گرفتند SNPها می‌باشند. SNPها چندشکلی مبتنی بر تفاوت در یک نوکلئوتید می‌باشند که منبع ژنتیکی عمده از تغییرات فنوتیپی درون یک‌گونه بشمار می‌روند. نشانگرهای مبتنی بر SNPها هم بارز و دو آللی می‌باشند. کارایی بالای SNPها، به دلیل حضور آنها در تمام نواحی ژنوم، اینترون‌ها و همچنین اگزون ها می‌باشد. هر فرد متعلق به یک گونه، دارای هزاران SNP می‌باشد که ترکیب این تنوع‌ها باعث می‌شود فنوتیپ هر فرد بصورت خاص و منحصر به فرد تظاهر یابد. به علت پایداری بیشتر، موتاسیون کمتر و حضور SNPها در بیشتر نقاط ژنوم، استفاده از آنها به عنوان نشانگر ژنتیکی در مطالعات گیاهی گسترش زیادی دارد (۷). در بررسی توالی-های EST در واریته‌های مختلف گوجه‌فرنگی، در هر ۷۰۰۰ جفت باز یک SNP گزارش شد. همچنین در این مطالعه سطح پایینی از چندشکلی در گوجه فرنگی گزارش شد (۲۳). در بررسی SNPها در گیاه بادام زمینی گزارش شد بیشترین SNPها مربوط به تبدیل بازهای C/T، G/A با فراوانی ۶۸/۲ درصد می‌باشد. در حالیکه تبدیل بازهای A/C و T/G با فراونی ۲۲/۷ درصد، G/C با فراوانی ۶/۸ درصد و A/T با ۲/۳ درصد کمترین فراوانی را داشتند (۹). با توجه به نقش مهم ژن‌های *SUN* و *OVATE* در کنترل شکل میوه گوجه فرنگی و عدم شناسایی تنوع‌های تک نوکلئوتیدی در این ژن‌ها، هدف از این مطالعه شناسایی SNPها در نواحی اگزونی این ژن‌ها در جمعیت‌های مختلف گوجه‌فرنگی به روش همردیفی چندگانه بود.

مواد و روش‌ها

بذور ۹۶ ژنوتیپ گوجه فرنگی از ۱۲ جمعیت مختلف (جدول ۱) در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه کشت شد. بعد از رسیدن گیاه به مرحله ۶-۴ برگی، نمونه‌های برگی از گیاهان برداشت و در نیتروژن مایع به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

استخراج DNA ژنومی و طراحی آغازگر: DNA ژنومی از برگ‌های جوان و سبز گیاه گوجه‌فرنگی به روش CTAB استخراج شد (۴). به منظور بررسی کیفیت و کمیت DNA از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و اسپکتوفتومتری استفاده شد. توالی نواحی کد کننده ژن‌های *SUN* و *OVATE* از پایگاه اطلاعاتی NCBI ذخیره و نواحی اینترونی و اگزونی آنها با استفاده از نرم‌افزار Softberry تعیین شد. آغازگرهای اختصاصی هر ژن (جدول ۲) با استفاده از نرم‌افزارهای FastPCR و Gen Runner طراحی و از نظر وجود ساختارهای ثانویه مثل آغازگر-دایمر و ساختارهای سنجاق سری بررسی شدند.

واکنش‌های PCR : قطعاتی با اندازه‌های ۴۴۳ (ژن *SUN*) و ۱۰۳۹ (ژن *OVATE*) جفت باز از نواحی کد کننده این دو ژن با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر شد. واکنش‌های PCR با استفاده از مستر میکس لیوفیلیزه (Bioneer، کره جنوبی) در دستگاه ترموسایکلر (Analytik jena، آلمان) انجام شد. برنامه دمایی مورد استفاده شامل واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه، ۳۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ ثانیه در دمای اتصال ۵۶ درجه سانتی‌گراد برای ژن *SUN* و ۵۵ درجه‌سانتی‌گراد برای ژن *OVATE* و دو دقیقه برای بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط نهایی به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از تکثیر قطعات ژنی، محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵درصد الکتروفورز و باندهای مربوطه مشاهده شد.

هضم قطعات تکثیر شده ژن‌های مورد مطالعه: به منظور هضم قطعات تکثیر شده دو ژن با آنزیم‌های *Pst1* و *TruI* (Fermentas، آلمان)، ابتدا الگوی برشی و طول قطعات حاصل از برش ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار FastPCR پیش‌بینی شد. سپس قطعات تکثیر شده دو ژن در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه (۹۶ ژنوتیپ) با استفاده از آنزیم‌های فوق‌الذکر بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده هضم شد. به منظور آشکارسازی قطعات حاصل از برش از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۸۰ به مدت یک و نیم ساعت استفاده شد.

1- IQ-domain

جدول ۱- مشخصات توده‌های گوجه‌فرنگی مورد استفاده در این مطالعه

Table 1– Description of the tomato landraces used in the study

منطقه Origin	اندازه میوه Fruit size	کد Code	منطقه Origin	اندازه میوه Fruit size	کد Code
Iran-Miandoab	کوچک Small	IRMI7	Iran-Urmia	بزرگ Large	IRU1
Iran-Bokan	متوسط Intermediate	IRB	Iran-Urmia	بزرگ Large	IRU2
Iran-Mahabad	متوسط Intermediate	IRMA1	Iran-Urmia	بزرگ Large	IRU3
Iran-Mahabad	بزرگ Large	IRMA2	Iran-Urmia	بزرگ Large	IRU4
Iran-Mahabad	متوسط Intermediate	IRMA4	Iran-Urmia	بزرگ Large	IRU5
Iran-Mahabad	کوچک Small	IRMA5	Iran-Urmia	متوسط Intermediate	IRU6
Iran-Mahabad	کوچک Small	IRMA6	Iran-Urmia	بزرگ Large	IRU7
Iran-Mahabad	کوچک Small	IRMA7	Iran-Urmia	متوسط Intermediate	IRU8
Iran-Mahabad	بزرگ Large	IRMA8	Iran-Urmia	متوسط Intermediate	IRU10
Iran-Mahabad	بزرگ Large	IRMA9	Iran-Urmia	بزرگ Large	IRU11
Iran-Mahabad	متوسط Intermediate	IRMA10	Iran-Urmia	بزرگ Large	IRU12
Iran-Qaraziaediin	بزرگ Large	IRQ1	Iran-Urmia	متوسط Intermediate	IRU13
Iran-Qaraziaediin	متوسط Intermediate	IRQ2	Iran-Urmia	متوسط Intermediate	IRU14
Iran-Qaraziaediin	بزرگ Large	IRQ3	Iran-Urmia	متوسط Intermediate	IRU15
Iran-Qaraziaediin	بزرگ Large	IRQ4	Iran-Urmia	متوسط Intermediate	IRU16
Iran-Qaraziaediin	متوسط Intermediate	IRQ5	Iran-Urmia	بزرگ Large	IRU18
Iran-Qaraziaediin	بزرگ Large	IRQ6	Iran-Urmia	متوسط Intermediate	IRU19
Iran-Qaraziaediin	متوسط Intermediate	IRQ7	Iran-Urmia	متوسط Intermediate	IRU20
Iran-Qaraziaediin	متوسط Intermediate	IRQ8	Iran-Urmia	بزرگ Large	IRU21
Iran-Khoy	متوسط Intermediate	IRKH1	Iran-Urmia	بزرگ Large	IRU22
Iran-Khoy	کوچک Small	IRKH2	Iran-Urmia	خیلی کوچک Very small	IRU23
Iran-Salmas	کوچک Small	IRSA1	Iran-Urmia	بزرگ Large	IRU24
Iran-Salmas	بزرگ Large	IRSA2	Iran-Urmia	متوسط Intermediate	IRU25

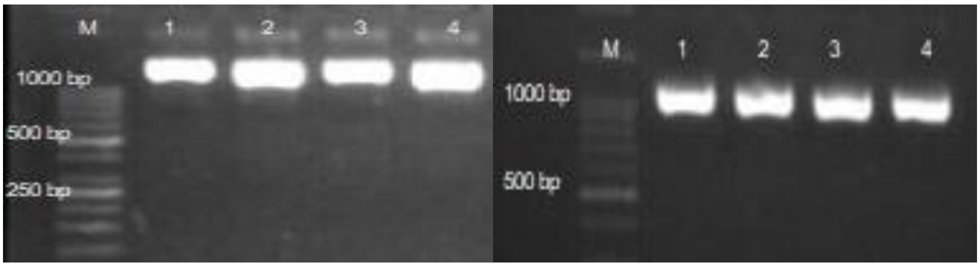
Iran-Sardasht	خیلی کوچک Very small	IRSR1	Iran-Urmia	متوسط Intermediate	IRU26
Iran-Sardasht	خیلی کوچک Very small	IRSR2	Iran-Oshnavieh	متوسط Intermediate	IRO1
Iran-Sardasht	کوچک Small	IRSR3	Iran-Oshnavieh	کوچک Small	IRO2
Iran-Sardasht	خیلی کوچک Very small	IRSR4	Iran-Oshnavieh	متوسط Intermediate	IRO3
Iran-Sardasht	کوچک Small	IRSR5	Iran-Oshnavieh	متوسط Intermediate	IRO4
Iran-Sardasht	کوچک Small	IRSR6	Iran-Oshnavieh	بزرگ Large	IRO5
Iran-Sardasht	متوسط Intermediate	IRSR7	Iran-Oshnavieh	خیلی کوچک Very small	IRO6
Iran-Sardasht	کوچک Small	IRSR8	Iran-Piranshahr	بزرگ Large	IRP1
Turkey-Iğdır	متوسط Intermediate	TUIG1	Iran-Piranshahr	بزرگ Large	IRP2
Turkey-Iğdır	بزرگ Large	TUIG2	Iran-Piranshahr	متوسط Intermediate	IRP3
Turkey-Iğdır	متوسط Intermediate	TUIG3	Iran-Piranshahr	متوسط Intermediate	IRP4
Turkey-Iğdır	متوسط Intermediate	TUIG4	Iran-Piranshahr	متوسط Intermediate	IRP5
Turkey-Iğdır	متوسط Intermediate	TUIG5	Iran-Piranshahr	متوسط Intermediate	IRP6
Turkey-Iğdır	بزرگ Large	TUIG6	Iran-Piranshahr	متوسط Intermediate	IRP7
Turkey-Iğdır	متوسط Intermediate	TUIG7	Iran-Piranshahr	کوچک Small	IRP8
Turkey-Iğdır	کوچک Small	TUIG8	Iran-Piranshahr	بزرگ Large	IRP9
Turkey-Iğdır	کوچک Small	TUIG9	Iran-Piranshahr	کوچک Small	IRP10
Turkey-Iğdır	متوسط Intermediate	TUIG10	Iran-Naghadeh	کوچک Small	IRN1
Turkey-Iğdır	کوچک Small	TUIG11	Iran-Naghadeh	کوچک Small	IRN2
Turkey-Iğdır	بزرگ Large	TUIG12	Iran-Miandoab	متوسط Intermediate	IRMI1
Turkey-Iğdır	خیلی کوچک Very small	TUIG13	Iran-Miandoab	بزرگ Large	IRMI2
Turkey-Iğdır	کوچک Small	TUIG14	Iran-Miandoab	متوسط Intermediate	IRMI3
Iran	متوسط Intermediate	CH Peto Early	Iran-Miandoab	متوسط Intermediate	IRMI4
Iran	متوسط Intermediate	Rio Grande	Iran-Miandoab	متوسط Intermediate	IRMI5
Turkey	متوسط Intermediate	H-2274	Iran-Miandoab	کوچک Small	IRMI6

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر دو ژن SUN و OVATE در گوجه‌فرنگی

Table 2- Characteristics of the primers designed for amplification of *SUN* and *OVATE* genes in tomato

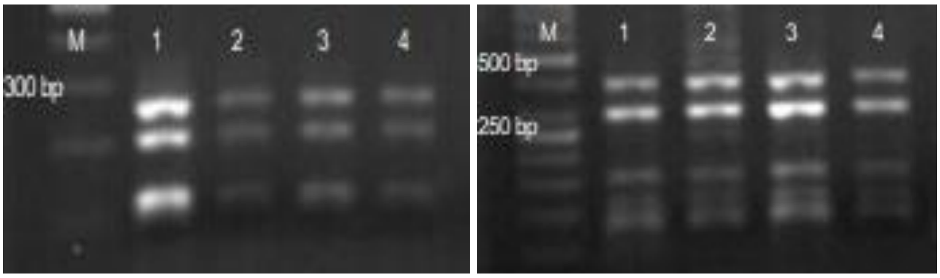
نام ژن Gene name	شماره دسترسی Accession number	توالی آغازگر (´3→´5) Primer sequence (5´→3´)	طول قطعه (جفت باز) Fragment length (bp)
SUN	EU491503.1	TGAGGCGAAAGGAACACC TCCAAGTGCTAAGGCTCT	443
OVATE	001247292.2	AGCTTCGGTTCTCCAGAGT CAGTAGGTGGGTGTGGGAT	1039

توالی‌یابی: با توجه به این که هضم آنزیمی توالی‌های تکثیری دو ژن در افراد مطالعه شده چندشکلی تولید نکرد بنابراین برای شناسایی SNPها در نواحی کدکننده ژن‌های *SUN* و *OVATE* از روش توالی‌یابی استفاده شد. چهار فرد از جمعیت‌های مشابه (جمعیت هایی با فاصله جغرافیایی نزدیک به هم)، انتخاب و بعد از انجام واکنش PCR، حدود ۴۰ میکرولیتر از محصول PCR هر نمونه روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۸۰ تفکیک گردید و سپس با استفاده از کیت خالص‌سازی (Qiagen، آمریکا) از ژل تخلیص و جهت توالی‌یابی به شرکت تکاپو زیست (تهران، ایران) ارسال گردید. با توجه به اینکه طول قطعات تکثیری برای هر دو ژن بیشتر از ۱۰۰۰ جفت باز بود برای قرائت کامل، توالی‌یابی از هر دو انتهای قطعات PCR و با استفاده از هر دو آغازگر پیشرو و معکوس که در واکنش PCR استفاده شده بود، انجام گرفت. برای اطمینان از صحت قطعات توالی‌یابی شده، ابتدا توالی‌ها در برابر ژنوم گوجه فرنگی بلاست شد و نواحی مشترک توالی‌های پیشرو و معکوس هر قطعه شناسایی و توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار FastPCR بازیابی شد.



شکل ۱- قطعات تکثیر شده ژن‌های *SUN* (سمت چپ) و *OVATE* (سمت راست) به ترتیب با اندازه‌های ۱۰۰۰ و ۱۰۳۹ جفت باز در ژنوتیپ‌های مختلف گوجه‌فرنگی (چاهک‌ها به ترتیب M: نشانگر 1Kb (Fermentas، آلمان) ، ۱: ترکیه، ۲: ارومیه،۳: بوکان (برای ژن *SUN*) و قره‌ضیائدین (برای ژن *OVATE*)، ٤: سردشت)

Figure 1- Amplified fragments of the *SUN* (left) and *OVATE* (right) gene fragments with the length of 1000 and 1039 bp, respectively in different tomato genotypes (Lanes, M: 1Kb DNA ladder (Fermentas, Germany), 1:Turkey, 2: Urmia, 3:Bukan (for the *SUN* gene) and Qaraziaddin (for the *OVATE* gene), 4: Sardasht)



شکل ۲- هضم آنزیمی قطعات تکثیر شده ژن‌های *SUN* (سمت چپ) و *OVATE* (سمت راست) با آنزیم برشی *TruI* در ژنوتیپ‌های مختلف گوجه فرنگی (M: نشانگر اندازه 1Kb (Ferments، آلمان)، چاهک‌های ۱ تا ٤ نمونه‌های هضم شده، ۱: ترکیه، ۲: ارومیه،۳: بوکان (برای ژن *SUN*) و قره‌ضیاءالدین (برای ژن *OVATE*)، ٤: سردشت)

Figure 2- Digestion of the amplified fragments of the *SUN* (left) and *OVATE* (right) genes by using *TruI* enzyme in different tomato genotypes (M: 1Kb DNA ladder (Fermentas, Germany), Lanes 1 to 4 digested samples, 1: Turkey, 2: Urmia, 3: Bukan (for *SUN* gene) and Qaraziaddin (for *OVATE* gene), 4: Sardasht)

CGGGGGCTTTTTGGCGTTTTGCTATAGCACGGCAGCAGCTGCTGAGGCTGCTGTAGCTGCTGCTAATGC
TGCTGCTGATGTTATCGGCTAACAGATGCTCCAAGTGAATTCAAAAGGAAACGCACACAAGCGGCTATTA
GAATCCAAAGTGCTTATCGCGCTCACCTGGTAAAACATCCTCTCTGGGAGCTCTGGTACTTTCACTCATAA
AATTTCACTGTGACCTTGTGGCAGGATCGTTATTAAGGCTCCTTCCTTCCTCCGCTGGAGCCTTTGAACGT
CTACTTTAACGAGGTGGGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCCTGACCGCTTCT
CCCGGCCAGCGGAAACAATTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTTAACTTGAGCCTGGTACCATTGACGCCT
TCCCTTCGGTTCTTTCTGTCAGCTCTTCCGGTTTTAGAACTTCGA**TTTTCAGGCCACAGAAGACCCAGCA
CAAACGGCATCCATGGTACCAGACTCAAGATCAAAGAGGAGGGCACGAGGGACATAATTGTTTCCG
CTGGCCGGGAGAAGCGGTCAGGAGTTCCAAAGCGTTTTCATAGATGCTGAAATTTTGAGGTACCCA
CCTCGCTAAAGTAAACGTTCATACGCCCCAGCTGGAAATCGGAGACGCCATAGTAACCATCCTGCC
TTCAGATCCACTCCAACTTCTAATGCCATATGTCCTCATCCTTCGAGGTGTATACAGGCTGTACCTA
CAACCCCGAGCCCTCTAAGGCCGTCTTCCCCAATATGTAATCAAGTTTCCAAACATTAGTTCAACTA
TACTAAATCTAT**AAAAAAGACCTAAAACACATCTTATTAGACTTTTATGGTTTGGAACTGTAATATGGTT
TTGTTCCAAGCAT

شکل ۳- ناحیه اینترونی (قسمت‌های پر رنگ) ۳٦۹ جفت بازی شناسایی شده در قطعه تکثیری ژن *SUN*

Figure 3- Detected intron region (Bold letters) in the amplified fragment of the *SUN* gene with a length of 369 bp

سپس هم‌ردیفی چندگانه بین توالی‌های مربوط به هر ژن توسط نرم‌افزار Clastal Omega جهت شناسایی SNPها انجام گرفت.

نتایج و بحث

تکثیر و هضم قطعات ژنی: هضم قطعات تکثیری بخشی از نواحی کد کننده دو ژن *SUN* و *OVATE* به ترتیب به طول ۴۴۳ (در روی ژل قطعه‌ای در حدود ۱۰۰۰ جفت باز مشاهده شد) و ۱۰۳۹ جفت باز (شکل ۱) با استفاده از آنزیم‌های *TruI* و *Pst1* چندشکلی بین ۹۶ ژنوتیپ به لحاظ الگوی برشی نشان نداد (شکل ۲).

شناسایی ناحیه اینترونی *SUN*: بعد از انجام واکنش PCR برای ۹۶ ژنوتیپ گوجه‌فرنگی و الکتروفورز قطعات تکثیری، باندی به طول ۱۰۰۰ جفت باز مشاهده گردید، در حالی که برای این ژن آغازگرهایی برای تکثیر قطعه‌ای به طول ۴۴۳ جفت باز طراحی شده بود. توالی‌یابی و بررسی توالی قطعات تکثیری این ژن توسط نرم‌افزار Softberry منجر به شناسایی یک ناحیه اینترونی ۳۶۹ جفت بازی در این ژن شد (شکل ۳).

همردیفی توالی‌ها و شناسایی SNPها در ژن *SUN*: بر اساس نتایج همردیفی بین توالی نمونه‌های انتخابی جمعیت‌های ترکیه، ارومیه، بوکان و پیرانشهر در نواحی اگزونی (شکل ۴) و اینترونی (شکل ۵) ژن *SUN*، جهش مربوط به بازهای G/A، T/C و T/G در این ژن مشاهده شد. بیشترین جهش در نواحی اگزونی مربوط به تبدیل بازهای G/T بود در حالی‌که در نواحی اینترونی بیشترین جهش مربوط به تبدیل بازهای T/C بود (جدول ۳).

همردیفی توالی‌ها و شناسایی SNPها در ژن *OVATE*: همردیفی بین توالی نمونه‌های انتخاب شده از جمعیت‌های ارومیه، ترکیه، قره‌ضیاءالدین و پیرانشهر نشان داد که جهش‌های مربوط به تبدیل بازهای G/A، T/C و T/C در ژن *OVATE* مشاهده می‌شود. بیشترین جهش مربوط به تبدیل باز G/A و T/C بود (شکل ۶، جدول ۴).

جدول ۳- فراوانی SNPهای شناسایی شده در ژن *SUN* در ژنوتیپ‌های گوجه‌فرنگی

Table 3- Frequency of the identified SNPs in *SUN* gene in tomato genotypes

نوع SNP SNP type	تعداد SNP در اگزون Number of SNPs in exon	تعداد SNP در اینترون Number of SNPs in intron	تعداد کل SNP Total SNPs	درصد SNP SNP percentage
G/A	1	2	3	30
T/C	1	4	5	50
T/G	2	-	2	20

در ژن *SUN* از ده SNP شناسایی شده، چهار SNP در ناحیه اگزونی و شش SNP در ناحیه اینترونی مشاهده شد. بطوریکه از کل SNPهای شناسایی شده در ژن *SUN*، ۸۰ درصد آنها از نوع همجنس با فراوانی ۳۰ درصد A/G و ۵۰ درصد T/C و ۲۰ درصد جهش ناهمجنس از نوع T/G بود. بیشترین جهش‌ها هم در نواحی اگزونی هم در نواحی اینترونی از نوع همجنس (C/T و A/G) بود. در ژن *OVATE* پنج SNP شناسایی شد. بطوریکه ۸۰ درصد جهش‌ها از نوع همجنس با فراوانی ۴۰ درصد G/A، ۴۰ درصد C/T و ۲۰ درصد

جهش از نوع ناهمجنس فقط از نوع G/T می‌باشد. درکل در توالی ژن *SUN* به ازای هر ۱۰۰ جفت باز ۱/۱ SNP (به طور متوسط ۰/۹ SNP در ناحیه اگزون و ۱/۶۲ SNP در ناحیه اینترون در هر ۱۰۰ جفت باز) مشاهده شد. دلیل فراوانی کم تعداد SNP در ناحیه اگزونی احتمالا به علت کمبود جهش در ناحیه کد کننده ژنی و محفوظ بودن آن در طول تکامل گیاه می‌باشد (۱). در کل در توالی تکثیر شده ژن *OVATE* به ازای هر ۱۰۰ جفت باز بطور میانگین ۰/۵ SNP در ناحیه اگزون شناسایی گردید.

```
SL.s_buk      AGCAGCTGCTGAGGCTGCTGTAGCTGCTGCTAATGCTGCTGCTGATGTTATCGGCTAACA
SL.s_sar      AGCAGCTGCTGAGGCTGCTGTAGCTGCTGCTAATGCTGCTGCTGATGTTATCGGCTAACA
SL.s_urm      AGCAGCTGCTGAGGCTGCTGTAGCTGCTGCTAATGCTGCTGCTGATGTTATCGGCTAACA
SL.s_tur      AGCAGCTGCTGAGGCTGCTGTAGCTGCTGCTAATGCTGCTGCTGATGTTATCGGCTAACA
              ************************************************************

SL.s_buk      GATGCTCCAAGTGAATCCAAAAGGAAACGCACACAAGCGGCTATTAGAATCCAAAGTGCT
SL.s_sar      GATGCTCCAAGTGAATTCAAAAGGAAACGCACACAAGCGGCTATTAGAATCCAAAGTGCT
SL.s_urm      GATGCTCCAAGTGAATTCAAAAGGAAACGCACACAAGCGGCTATTAGAATCCAAAGTGCT
SL.s_tur      GATGCTCCAAGTGAATTCAAAAGGAAACGCACACAAGCGGCTATTAGAATCCAAAGTGCT
              **************** *******************************************

SL.s_buk      TATCGCGCTCACCTGGTAAAACATCCTCTCTGGGAGCTCTGGTACTTTCACTCATAAAAT
SL.s_sar      TATCGCGCTCACCTGGTAAAACATCCTCTCTGGGAGCTCTGGTACTTTCACTCATAAAAT
SL.s_urm      TATCGCGCTCACCTGGTAAAACATCCTCTCTGGGAGCTCTGGTACTTTCACTCATAAAAT
SL.s_tur      TATCGCGCTCACCTGGTAAAACATCCTCTCTGGAAGCTCTGGTACTTTCACTCATAAAAT
              ********************************* **************************

SL.s_buk      TTCACTGTGACCTTGTGGCAGGATCGTTATTAAGGCTCCTTCCTTCCTCCGCTGGAGCCT
SL.s_sar      TTCACTGTGACCTTGTGGCAGGATCGTTATTAAGGCTCCTTCCTTCCTCCGCTGGAGCCT
SL.s_urm      TTCACTGTGACCTTGTGGCAGGATCGTTATTAAGGCTCCTTCCTTCCTCCGCTGGAGCCT
SL.s_tur      TTCACTGTGACCTTGTGGCAGGATCGTTATTAAGGCTCCTTCCTTCCTCCGCTGGAGCCT
              ************************************************************

SL.s_buk      TTGAACGTCTACTTTAACGAGGTGGGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAACGCTTT
SL.s_sar      TTGAACGTCTACTTTAACGAGGTGGGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAACGCTTT
SL.s_urm      TTGAACGTCTACTTTAACGAGGTGGGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAACGCTTT
SL.s_tur      TTGAACGTCTACTTTAACGAGGTGGGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAACGCTTT
              ************************************************************

SL.s_buk      GCAACTCCTGACCGCTTCTCCCGGCCAGCGGAAACAATTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCG
SL.s_sar      GCAACTCCTGACCGCTTCTCCCGGCCAGCGGAAACAATTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCG
SL.s_urm      GCAACTCCTGACCGCTTCTCCCGGCCAGCGGAAACAATTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCG
SL.s_tur      GCAACTCCTGACCGCTTCTCCCGGCCAGCGGAAACAATTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCG
              ************************************************************

SL.s_buk      TTTAACTTGAGCCTGGTACCATTGACGCCTTCCCTTCGGTTCTTTCTGTCAGCTCTTCCG
SL.s_sar      TTTAACTTGAGCCTGGTACCATTGACGCCTTCCCTTCGGTTCTTTCTGTCAGCTCTTCCG
SL.s_urm      TTTAACTTGAGCCTGGTACCATTGACGCCTTCCCTTCGGTTCTTTCTGTCAGCTCTTCCG
SL.s_tur      TTTAACTTGAGCCTGGTACCATTGACGCCTTCCCTTCGGTTCTTTCTGTCAGCTCTTCCG
              ************************************************************

SL.s_buk      TTTTTAGAACTTCGA
SL.s_sar      GTTTTATAACTTCGA
SL.s_urm      GTTTTAGAACTTCGA
SL.s_tur      GTTTTAGAACTTCGA
               ***** ********
```

شکل ٤- همردیفی چندگانه توالی ناحیه اگزونی ژن *SUN* در چهار ژنوتیپ گوجه‌فرنگی (Urm: ارومیه، Buk: بوکان، Tur: ترکیه، Sar: سردشت)، (SNPها بصورت پررنگ و ایتالیک مشخص شدند)

Figure 4- Multiple alignment of the exonic region of the *SUN* gene in four tomato genotypes (Urm: Urmia, Buk: Bukan, Tur: Turkey, Sar: Sardasht), (SNPs are highlighted as bold and italic)

```
SL.s_sar      TTTTCAGGCCACAGAAGACCCAGCACAAACGGCATCCATGGTACCAGACTCAAGATCAAA
SL.s_tur      TTTTCAGGCCACAGAAGACCCAGCACAAACGGCATCCATGGTACCAGACTCAAGATCAAA
SL.s_urm      TTTTCAGGCCACAGAAGACCCAGCACAAACGGCATCCATGGTACCAGACTCAAGATCAAA
SL.s_buk      TTTTCAGGCCACAGAAGACCCAGCACAAACGGCATCCATGGTACCAGACCCAAGATCAAA
              ************************************************* **********

SL.s_sar      GAGGAGGGCACGAGGGACATAATTGTTTCCGCTGGCCGGGAGAAGCGGTCAGGAGTTCCA
SL.s_tur      GAGGAGGGCACGAGGGACATAATTGTTTCCGCTGACCGGGAGAAGCGGTCAGGAGTTCCA
SL.s_urm      GAGGAGGGCACGAGGGACATAATTGTTTCCGCTGGCCGGGAGAAGCGGTCAGGAGTTCCA
SL.s_buk      GAGGAGGGCACGAGGGACATAATTGTTTCCGCTGGCCGGGAGAAGCGGTCAGGAGTTCCA
              ********************************** *************************

SL.s_sar      AAGCGTTTTCATAGATGCTGAAATTTTGAGGTACCCACCTCGCTAAAGTAAACGTTCATA
SL.s_tur      AAGCGTTTTCATAGATGCTGAAATTTTGAGGTACCCACCTCGCTAAAGTAAACGTTCATA
SL.s_urm      AAGCGTTTTCATAGATGCTGAAATTTTGAGGTACCCACCTCGCTAAAGTAAACGTTCATA
SL.s_buk      AAGCGTTTTCATAGATGCTGAAATTTTGAGGTACCCACCTCGCTAAAGTAAACGTTCATA
              ************************************************************

SL.s_sar      CGCCCCAGCTGGAAATCGGAGACGCCATAGTAACCATCCTGCCTTCAGATCCACTCCAAC
SL.s_tur      CGCCCCAGCTGGAAATCGGAGACGCCATAGTAACCATCCTGCCTTCAGATCCACTCCAAC
SL.s_urm      CGCCCCAGCTGGAAATCGGAGACGCCATAGTAACCATCCTGCCTTCAGATCCACTCCAAC
SL.s_buk      CGCCCCAGCTGGAAATCGGAGACGCCATAGTAACCATCCTGCCTTCAGATCCACTCCAAC
              ************************************************************

SL.s_sar      TTCTAATGCCATATGTCCCCATCCTTCGAGGTGTATACAGGCTGTACCTACAACCCCGAG
SL.s_tur      TTCTAATGCCATATGTCCTCATCCTTCGAGGTGTATACAGGCTGTACCTACAACCTCGAG
SL.s_urm      TTCTAATGCCATATGTCCTCATCCTTCGAGGTGTATACAGGCTGTACCTACAACCCCGAG
SL.s_buk      TTCTAATGCCATATATCCTCATCCTTCGAGGTGTATACAGGCTGTACCTACAACCCCGAG
              ************** *** ************************************ ****

SL.s_sar      CCCTTTAAGGCCGTCTTCCCCAATATGTAATCAAGTTTCCAAACATTAGTTCAACTATAC
SL.s_tur      CCCTCTAAGGCCGTCTTCCCCAATATGTAATCAAGTTTCCAAACATTAGTTCAACTATAC
SL.s_urm      CCCTCTAAGGCCGTCTTCCCCAATATGTAATCAAGTTTCCAAACATTAGTTCAACTATAC
SL.s_buk      CCCTCTAAGGCCGTCTTCCCCAATATGTAATCAAGTTTCCAAACATTAGTTCAACTATAC
              **** *******************************************************

SL.s_sar      TAAATCTAT
SL.s_tur      TAAATCTAT
SL.s_urm      TAAATCTAT
SL.s_buk      TAAATCTAT
              *********
```

شکل ۵- همردیفی چندگانه توالی ناحیه اینترونی ژن *SUN* در چهار ژنوتیپ گوجه فرنگی (Urm: ارومیه، Buk: بوکان، Tur: ترکیه، Sar: سردشت)، (SNPها بصورت پررنگ و ایتالیک مشخص شدند)

Figure 5- Multiple alignment of the intron region of the SUN gene in four different tomato genotypes (Urm: Urmia, Buk: Bukan, Tur: Turkey, Sar: Sardasht), (SNPs are highlighted as bold and italic)

جدول ٤ -فراوانی SNPهای شناسایی شده در ژن OVATE در ژنوتیپ‌های مختلف گوجه‌فرنگی

Table 4- Frequency of the identified SNPs in *OVATE* gene in different tomato genotypes

نوع SNP SNP type	تعداد SNP Number of SNPs	درصد SNP SNP percentage
A/G	2	40
G/T	1	20
C/T	2	40

```
SL.o_tur      TCTCTGGGGAGCCGGCCCTGAAGGCTCCGGTGTGTAAGTAAAGCACGTATAACCCTTGAA
SL.o_qrz      TCTCTGGGGAGCCGGCCCTGAAGGCTCCGGTGTGTAAGTAAAGCACGTATAACCCTCGAA
SL.o_urm      TCTCTGGGGAGCCGGCCCTGAAGGCTCCGGTGTGTAAGTAAAGCACGTATAACCCTTGAA
SL.o_sar      TCTCTGGGGAGCCGGCCCTGAAGGCTCCGGTGTGTAAGTAAAGCACGTATAACCCTTGAA
              ******************************************************** ***

SL.o_tur      ACAACGACGAACATATGGCATTAGAAGTTGGAAAGGATCTGACGGCCAGGATAGTTACAA
SL.o_qrz      ACAACGACGAACATATGGCATTAGAAGTTGGAAAGGATCTGACGGCCAGGATAGTTACAA
SL.o_urm      ACAACGACGAACATATGGCATTAGAAGTTGGAAAGGATCTGACGGCCAGGATAGTTACAA
SL.o_sar      ACAACGACGAACATATGGCATTAGAAGTTGGAAAGGATCTGACGGCCAGGATAGTTACAA
              ************************************************************

SL.o_tur      TGGCTCCTCCCATCTCCAGCTGGAGCGTAAGAACGTCTACTTTAACGAGGTGCGTACCTC
SL.o_qrz      TGGCTCCTCCCATCTCCAGCTGGAGCGTAAGAACGTCTACTTTAACGAGGTGCGTACCTC
SL.o_urm      TGGCTCCTCCCATCTCCAGCTGGAGCGTAAGAACGTCTACTTTAACGAGGTGCGTACCTC
SL.o_sar      TGGCTCCTCCCATCTCCAGCTGGAGCGTAAGAACGTCTACTTTAACGAGGTGCGTACCTC
              ************************************************************

SL.o_tur      AAAATTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCCTGACCGCTTCTCCCGGCCAGCGGA
SL.o_qrz      AAAATTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCCTGACCGCTTCTCCCGGCCAGCGGA
SL.o_urm      AAAATTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCCTGACCGCTTCTCCCGGCCAGCGGA
SL.o_sar      AAAATTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCCTGACCGCTTCTCCCGGCCAGCGGA
              ************************************************************

SL.o_tur      AACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGATCTTGAGCCCGGTACCATGGACGCCCTC
SL.o_qrz      AACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGATCTTGAGCCCGGTACCATGGACGCCCTC
SL.o_urm      AACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGATCTTGAGCCCGGTACCATGGACGCCCTC
SL.o_sar      AACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGATCTTGAGCCCGGTACCATGGACGCCCTC
              ************************************************************

SL.o_tur      CGTGCCGGTCCCTTCGGTCAACTCTTCCGTCCCGACAACTTCGTTTTCGGCCAGTCCCGG
SL.o_qrz      CGTGCCGGTCCCTTCAGTCAACTCTTCCGTCCCGACAACTTCGTTTTCGGCCAGTCCCGG
SL.o_urm      CGTGCCGGTCCCTTCGGTCAACTCTTCCGTCCCGACAACTTCGTTTTCGGCCAGTCCCGG
SL.o_sar      CGTGCCGGTCCCTTCGGTCAACTCTTCCGTCCCGACAACTTCGTTTTCGGCCAGTCCCGG
              *************** ********************************************

SL.o_tur      TGCTGGTAAAACTGGGTAGGGTTCTTTATTCTTTTTGGTTTAAATTGGACGAAAAAAACGA
SL.o_qrz      TGCTGGTAAAACTGGGTAGGGTTCTTTATTCTTTTTGGTTTAAATTGGACGAAAAAAACGA
SL.o_urm      TGCTGGTAAAACTGGGTAGGGTTCTTTATTCTTTTTGGTTTAAATTGGACGAAAAAAACGA
SL.o_sar      TGCTGGTAAAACTGGGTAGGGTTCTTTATTCTTTTTGGTTTAAATTGGACGAAAAAAACGA
              ************************************************************

SL.o_tur      GACTCAAGAGACAGAAGAAATGACCGAAGGAACCGGCACGGACGGCGCCCATGGTCCCGG
SL.o_qrz      GACTCAAGAGACAGAAGAAATGACCGAAGGAACCGGCACGGACGGCGCCCATGGTCCCGG
SL.o_urm      GACTCAAGAGACAGAAGAAATGACCGAAGGAACCGGCACGGACGGCGCCCATGGTCCCGG
SL.o_sar      GACTCAAGAGACAGAAGAAATGACCGAAGGAACCGGCACGGACGACGCCCATGGTCCCGG
              ******************************************** ***************

SL.o_tur      GCTCAAAATCAACGAGGACGGCACGAGGGACATCCTTGTTTCCGTTGGCCGGGGAAGCGG
SL.o_qrz      GCTCAAAATCAACGAGGACGGCACGAGGGACATCCTTGTTTCCGTTGGCCGGGGAAGCGG
SL.o_urm      GCTCAAAATCAACGAGGACGGCACGAGGGACATCCTTGTTTCCGTTGGCCGGGGAAGCGG
SL.o_sar      GCTCAAAATCAACGAGGACGGCACGAGGGACATCCTTGTTTCCGTTGGCCGGGGAAGCGG
              ************************************************************

SL.o_tur      TCAGGAGTTCCAAAGCGTTTTCACAGATGCTGAAATTTTGAGGTACGCACCTCGTTAAAG
SL.o_qrz      TCAGGAGTTCCAAAGCGTTTTCACAGATGCTGAAATTTTGAGGTACGCACCTCGTTAAAG
SL.o_urm      TCAGGAGTTCCAAAGCGTTTTCACAGATGCTGAAATTTTGAGGTACGCACCTCGTTAAAG
SL.o_sar      TCAGGAGTTCCAAAGCGTTTTCACAGATGCTGAAATTTTGAGGTACGCACCTCGTTAAAG
              ************************************************************

SL.o_tur      TAGACTTTCATACGCCCCAGCGGGAGATGGGGGGGGCCATTGTAACTATCCTGGCCGTCA
SL.o_qrz      TAGACCTTCATACGCCCCAGCGGGAGATGGGGGGGGCCATTGTAACTATCCTGGCCGTCA
```

```
SL.o_urm     TAGACCTTCATACGCCCCAGCGGGAGATGGGGGGGGCCATTGTAACTATCCTGGCCGTCA
SL.o_sar     TAGACCTTCATACGCCCCAGCGGGAGATGGGGGGGGCCATTGTAACTATCCTGGCCGTCA
             ***** ******************************************************

SL.o_tur     GATCCATTCCAACTTCTAAAGCCCATATGGTCGTCTTTCGCTTCGAGGGGGTCTACGGCT
SL.o_qrz     GATCCATTCCAACTTCTAAAGCCCATATGGTCGTCGTTCGCTTCGAGGGGGTCTACGGCT
SL.o_urm     GATCCATTCCAACTTCTAAAGCCCATATGGTCGTCGTTCGCTTCGAGGGGGTCTACGGCT
SL.o_sar     GATCCATTCCAACTTCTAAAGCCCATATGGTCGTCGTTCGCTTCGAGGGGGTCTACGGCT
             *********************************** ************************

SL.o_tur     GTACCACACACCGAGCCCTTAAAGACCGTGCTCGCCAGAGACGGTCGCCCGCAATTTTCT
SL.o_qrz     GTACCACACACCGAGCCCTTAAAGACCGTGCTCGCCAGAGACGGTCGCCCGCAATTTTCT
SL.o_urm     GTACCACACACCGAGCCCTTAAAGACCGTGCTCGCCAGAGACGGTCGCCCGCAATTTTCT
SL.o_sar     GTACCACACACCGAGCCCTTAAAGACCGTGCTCGCCAGAGACGGTCGCCCGCAATTTTCT
             ************************************************************

SL.o_tur     GTCCTTGACCGGAAAGCCCTTTCCTGGAGTGATACGTGAGGCGTTCTCAGACATTTGGGA
SL.o_qrz     GTCCTTGACCGGAAAGCCCTTTCCTGGAGTGATACGTGAGGCGTTCTCAGACATTTGGGA
SL.o_urm     GTCCTTGACCGGAAAGCCCTTTCCTGGAGTGATACGTGAGGCGTTCTCAGACATTTGGGA
SL.o_sar     GTCCTTGACCGGAAAGCCCTTTCCTGGAGTGATACGTGAGGCGTTCTCAGACATTTGGGA
             ************************************************************

SL.o_tur     GACTTGTTTTA
SL.o_qrz     GACTTGTTTTA
SL.o_urm     GACTTGTTTTA
SL.o_sar     GACTTGTTTTA
             ***********
```

شکل ٦- همردیفی چندگانه توالی ژن *OVATE* در چهار ژنوتیپ گوجه فرنگی (Urm: ارومیه، Tur: ترکیه، Qrz: قره‌ضیاءالدین، Sar: سردشت)، (SNPها بصورت پررنگ و ایتالیک مشخص شدند)

Figure 6- Multiple alignment of the *OVATE* gene in four different tomato genotypes (Urm: Urmia, Tur: Turkey, Qrz: Qaraziaddin, Sar: Sardasht), (SNPs are highlighted as bold and italic)

در تحقیقی با بررسی بیش از ۱۵ لاین گوجه فرنگی با استفاده از روش توالی یابی مجدد قطعات تکثیری، ۵۵ SNP شناسایی شد که ۲۹ SNP در ناحیه اینترونی و ۲۶ SNP در ناحیه اگزونی بود (۱۱). در تحقیق حاضر نیز در ناحیه اگزونی دو ژن *SUN* و *OVATE*، SNPهای کمتری مشاهده گردید. در تحقیق دیگری در بررسی ژن های ذرت گزارش شد که جهش‌های همجنس بیشتر از جهش‌های ناهمجنس می‌باشد. در این تحقیق ۶۲۵ جهش همجنس (A/G + T/C) و ۴۲۹ جهش ناهمجنس (A/C + A/T + G/C + G/T) مشاهده شد که نسبت جهش‌های همجنس به ناهمجنس ۱/۴۶ گزارش گردید (۱۵). در تحقیق حاضر نیز تعداد جهش‌های همجنس بیشتر از ناهمجنس بود بطوریکه ۸ جهش همجنس (A/G + T/C) و ۲ جهش ناهمجنس (G/T) در ژن *SUN* و ۴ جهش همجنس (A/G + T/C) و ۱ جهش ناهمجنس (G/T) در ژن *OVATE* مشاهده شد. همچنین در هر دو ژن نسبت جهش‌های همجنس به ناهمجنس ۴:۱ بود.

در مطالعه توالی ژنومی گیاه بادام زمینی (*Arachis hypogaea* L.)، ۴۴ SNP شناسایی شد (یک SNP به ازای هر ۱۰۱۱ جفت باز از توالی ژنومی) که بیش‌ترین SNPها مربوط به تبدیل بازهای C/T، G/A با فراوانی ۶۸/۲ درصد بود. در حالی‌که تبدیل بازهای C/A و G/T با فراوانی ۲۲/۷ درصد، (G/C (C/G با فراوانی ۶/۸ درصد و (A/T (T/A با ۲/۳ درصد کمترین فراوانی را داشتند (۸). در تحقیق حاضر نیز در ژن *SUN* ، ۸۰ درصدSNPها از نوع همجنس با فراوانی۳۰ درصد A/G و ۵۰ درصد T/C و ۲۰ درصد جهش ناهمجنس از نوع T/G بود. در ژن *OVATE* ۸۰ درصد جهش‌ها از نوع همجنس با فراوانی ۴۰ درصد G/A، ۴۰ درصد C/T و ۲۰ درصد جهش از نوع ناهمجنس از نوع G/T می‌باشد. در بررسی ۸۰ فرد از ۸ توده در گیاه ریحان در ژن‌های اوژنول O-متیل‌ترانسفراز و چاویکول O-متیل‌ترانسفراز، شش SNP در ژن اوژنول O-متیل ترانسفراز مشاهده شد که از نوع G/A و C/T بود. در ژن چاویکول O-متیل ترانسفراز، ۱۲ SNP از نوع G/A، C/T، G/C و A/T شناسایی شد که بیشترین نوع SNPها از نوع همجنس بود (۱). در تحقیق حاضر نیز در ژن *SUN* ۱۰ و در ژن *OVATE* ۵ SNP از نوع A/G، T/C و G/T مشاهده گردید. پیشنهاد می‌شود که از SNPهای شناسایی شده در این تحقیق در برنامه‌های اصلاح گوجه‌فرنگی برای تهیه نقشه‌های ژنتیکی با وضوح بالا و انتخاب ژنومی و نقشه‌یابی ارتباطی و مطالعه تکامل جمعیت استفاده شود. همچنین ارتباط بین SNPهای شناسایی

شده در این مطالعه و شکل میوه گوجه‌فرنگی به منظور معرفی نشانگرهای عملکردی بررسی شود و طبقه‌بندی‌های ژرم‌پلاسم مطالعه شده با استفاده از نشانگرهای مبتنی بر SNPهای شناسایی شده در این تحقیق صورت گیرد.

نتیجه‌گیری

بطور کلی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که میانگین تعداد SNPها به ازای هر ۱۰۰ جفت باز در نواحی اگزونی و اینترونی ژن *SUN* به ترتیب ۰/۹ و ۱/۶۲ بود. همچنشن در ژن *OVATE* به ازای هر ۱۰۰ جفت باز نیم SNP در ناحیه اگزونی شناسایی شد. نتایج این تحقیق نشان داد که چندشکلی در نواحی اگزونی ژن *SUN* کم می باشد. همچنین رایج‌ترین نوع جهش‌ها با توجه به هم ردیفی توالی ژن‌های مورد مطالعه در جمعیت‌های مختلف گوجه‌فرنگی از نوع جهش‌های همجنس A/G وT/C بود. در کل در توالی‌های بررسی شده این دو ژن، فراوانی SNPها در ژن *SUN* بیشتر از ژن *OVATE* بود.

منابع

1- Aizi M., and Abdollahi Mandolkani B. 2017. Identification of SNPs in exonic regions of eugenol O-methyl transferase and chavicol O-methyl transferase genes in basil. Agricultural Biotechnology Journal 10(1): 117-105. (In Persian with English abstract)

2- Bai Y., and Lindhout P. 2000. Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? Annals of Botany 100: 1085-1094.

3- Ching A., Caldwell K., Jung M., Dolan M., Smith O., and Tingey S. 2002. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. Bioorganic & Medicinal Chemistry Genetics 3(19): 1-14.

4- De Masi L., Castaldo D., Galano G., Minasi P., and Laratta B. 2006. Genotyping of fig (*Ficus carica* L.) via RAPD markers. Journal of the Science of Food and Agriculture 85: 22-35.

5- Frary A., Nesbitt TC., Frary A., Grandillo S., Van Der Knaap E., Cong B., Liu J., Meller J., Elber R., and Alpert KB. 2000. fw2.2: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. Science 289: 85-88.

6- Gaderi R., and Rezaei R. 2009. Common Guide and Tomato Cultivation. Tehran University, Press, 395p. (In Persian)

7- Gupta PK. 2008. Single-molecule DNA sequencing technologies for future genomics research. Trends in Biotechnology 26: 602-11.

8- Hackbusch J., Richter K., Muller J., Salamini F., and Uhrig JF. 2005 A. Central role of *Arabidopsis thaliana* ovate family proteins in networking and subcellular localization of 3-aa loop extension homeodomain proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102: 4908-4912.

9- Huang X., Wei X., Sang T., Zhao Q., Feng Q., Zhao Y., Li C., Zhu C., Lu T., and Zhang Z. 2010. Genome-wide association studies of 14 agronomic traits in rice landraces. Nature Genetics 42: 961-967.

10- Jiang N., Gao D., Xiao H., Francis D., and Van der Knaap E. 2009. Genome organization of the tomato sun locus and characterization of the unusual retrotransposon Rider. Plant Journal 60: 181-193.

11- Joanne AL., and Angela MB. 2005. Tomato SNP discovery by EST mining and resequencing. Molecular Breeding 16: 343-349.

12- Kalloo G., and Bergh BO. 1993 Genetic improvement of vegetable crops. Pergamon Press, Oxford and New York, 833 p.

13- Klee HJ., and Giovannoni JJ. 2011. Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. Annual Review of Genetics 45: 41-59.

14- Liu J., Van Eck J., Cong B., and Tanksley SD. 2002. A new class of regulatory genes underlying the cause of pear-shaped tomato fruit. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99: 13302-13306.

15- Mammadov J., Chen W., Mingus J., Thompson S., and Kumptla S. 2012. Development of versatile gene-based SNP assay in maize (Z*ea mays* L.). Molecular Breeding 29: 77-790.

16- Paduchuri P., Gohokar S., Thamke B., and Subhas M. 2010. Transgenic tomatoes. Advanced Biotechnology and Research 2: 69-72.

17- Rodriguez GR., Munos S., Anderson C., Sim SC., Michel A., Causse M., McSpadden Gardener B B., Francis D., and van der Knaap E. 2011. Distribution of *SUN*, *OVATE*, *LC*, and *FAS* in the tomato germplasm and the relationship to fruit shape diversity. Plant Physiology 156: 275-285.

18- Rodriguez GR., Pratta M., and Zorzoli R. 2006. Evaluation of plant and fruit traits in recombinant inbred lines of tomato obtained from a cross between *Lycopersicon esculentum* and *L. pimpinellifolium*. Cienciae Investigation Agraria 33(2): 111-118.

19- Stommel JR., and Haynes KG. 1994. Inheritance of beta-carotene content in the wild tomato species *Lycopersicon cheesmani*. Journal of Heredity 85(5): 401-404.

20- The Tomato Genome Consortium. 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. Nature 485: 635-641.

21- Wu S., Xiao H., Cabrera A., Meulia T., and Knaap E. 2011. *SUN* regulates vegetative and reproductive organ shape by changing cell division pattern. Plant Physiology 157(3): 1175-1186.

22- Xiao Z., Kapteyn J., and Gang D.R. 2008. A systems biology investigation of the MEP/terpenoid and shikimate/phenylpropanoid pathways points to multiple levels of metabolic control in sweet basil glandular trichomes. The Plant Journal 54(3): 349-361.

23- Yang W., Bai X., Eaton C., and Kamoun E. 2004. Discovery of single nucleotide polymorphisms in (*Lycopersicon esculentum)* by computer aided analysis of expressed sequenced tags. Molecular Breeding 14: 21-34.

Journal of Horticultural Science
Vol. 35, No.2, Summer 2021, P. 169-182
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۵، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۰، ص. ۱۸۲-۱۶۹
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Studying SNPs in *SUN* and *OVATE* Genes Responsible for Fruit Shape in Tomato

S. Khzereloo[1]- B. Abdollahi Mandoulakani[2*]
Received: 26-06-2019
Accepted: 16-02-2021

Introduction: Commercial tomato (*Solanum lycopersicum* L.), one of the most widely grown vegetable crops worldwide, belongs to the Solanaceae family. The marketability of the commercial tomato mostly depends on the fruit quality. Tomato fruit quality is determined mainly by color, texture, shape and flavor. Fruit shape, one of the important traits affecting the quality of tomato fruit, is controlled by multiple minor genes and quantitatively inherited. Two important genes, involved in fruit shape, are *SUN* and *OVATE* genes. The *SUN* gene, which is a member of the IQD (IQ-domain) gene family and the Calmodulin binding protein, controls fruit length. The more expression of both *SUN* and *OVATE* genes leads to increased fruit length. Moreover, the increased expression of *OVATE* gene reduces the size of flower and leaf components. Due to the important role of these genes in tomato fruit shape, identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) as a new generation of robust, frequent and reliable bi-allelic markers, in the coding regions of these genes might be necessary for generating functional markers associated with fruit shape.

Materials and Methods: Seeds of 96 tomato genotypes from 12 populations were grown in the research greenhouse of Faculty of Agriculture and Natural Resources of Urmia University. The genotypes had been collected from different regions of West Azerbaijan of Iran and Turkey (Iğdır). The young and green plant leaves were used for genomic DNA extraction. The quality and quantity of the extracted DNA was assessed using spectrophotometry and agarose gel electrophoresis. To identify SNPs in *SUN* and *OVATE* genes, specific primers were designed by using FastPCR and Gene Runner software for amplifying fragments from coding regions of these genes in 96 tomato genotypes. Then, the amplified fragments of both genes were digested by using restriction enzymes *TruI* and *PstI*. Due to the lack of polymorphism in the digested patterns obtained by the used enzymes, four individuals from populations with close geographical distance were selected and amplified. The amplified bands were then purified by a purification kit (Kiagen, USA) and sequenced (Bioneer, South Korea). Sequencing was performed from both ends of the PCR fragments using both the forward and reverse primers used in the PCR reactions. The exon and intron regions of the sequenced fragments were identified by Softberry software. Following the retrieval of the sequenced fragments of each gene using FastPCR and Softberry software, multiple sequence alignment using Clustal Omega was used to identify SNPs in the exon and intron of the genes.

Results and Discussion: Digestion of the amplified fragments of the genes using *TruI* and *PstI* restriction enzymes produced no polymorphism in the studied genotypes. Thus, four individuals were selected from geographically different populations and gene fragments were amplified, purified and sequenced in these genotypes. Sequencing of the amplified fragment of *SUN* gene revealed an intron region with a size of 369 bp. Out of the 10 SNPs detected in the *SUN* gene, four was found in the exon region, while the number of SNPs in intron was six. Of the total SNPs found in the *SUN* gene, the percentage of transition and transversion substitutions was 80 (50% T/C and 30% A/G) and 20 (T/G), respectively. In the *OVATE* gene, five SNPs were identified. The percentage of transition (40% G/A and 40% C/T) and transversion (20% G/T) substitutions in this genes were the same as *SUN*. The ratio of transition to transversion substitutions was 1:4 for both genes. The average number of SNPs in a 100 bp fragment in exonic and itronic region of *SUN* was 0.9 and 1.62, respectively, while it was 0.5 for exonic region of *OVATE* gene.

Conclusion: The results of the current study revealed low polymorphisms and point mutations in the exon regions of *SUN* and *OVATE* genes, suggesting that the coding regions of these genes were conserved during the tomato evolution. Also, the number of SNPs in intron was more than those of exon. Considering the important role of fruit quality, especially fruit shape, in tomato market, the SNPs found in the current study may be used in genetic diversity studies, genetic map preparation, and saturation and identification of the functional markers

1 and 2- M.Sc. Graduate in Agricultural Biotechnology and Professor, Department of Plant Production and Genetics, Urmia University, Urmia, respectively.
(*- Corresponding Author Email: b.abdollahi@urmia.ac.ir)
DOI: 10.22067/jhs.2021.61531.0

associated with tomato fruit shape. These markers could accelerate tomato breeding programs aimed fruit shape improvement.

Keywords: Fruit Shape, Single nucleotide polymorphism, Tomato, Transition substitution